

● 公表特許公營 (A)

平1-503275

④公表 平成1年(1989)11月9日

Int. Cl. *	專利記号	厅内整理番号	審查請求	未請求	予備審查請求	未請求	部門 (区分)	1 (1)
C 12 N 15/00		8717-4B						
	1/16	K-7421-4B						
C 12 P 21/00		C-6712-4B						

(全 14 頁)

④発明の名称 酵母ベクター

②特 種 昭63-502934

⑤議決文提出日 昭33(1988)12月8日

6022出 歸 路63(1988)4月8日

國際專利 PCT/GB88/00276

中國國際公證證號 W088/08027

國際公開日 昭63(1988)10月20日

優先権主張 ④1987年4月9日国イギリス(CB)第8708495

②発明者 ヒングリツフエ、エドワード イギリス国 ノッティンガムシャー、バートン ジョーイル、サムプ
ライ、レーン 16

④出 産 人 デルタ バイオテクノロジー
リミテッド
イギリス国 エヌジー・7 1エフデュー, ノッティンガム, カース
ル ブールバード, カースル コート (番地なし)

②代理人 井澤士 淺村 皓 外3名

④指定國 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), BR, CH(広域特許), DE(広域特許), DK, FI, FR(広域特許), GB, GB(広域特許), HU, IT(広域特許), JP, KR, LU(広域特許), NL(広域特許), SE(広域特許)

最終頁に続く

2. 組換えによって失われる DNA 配列、その 1 対が同じ方向性を有し他の 2 対が逆の方向性を有する 3 個の 2 kb PFLP 組換え部位、及び目的とする蛋白質又はペプチドをコードする DNA 配列を含むベクターであつて、上記組換えによつて失われる DNA 配列が上記同じ方向性を有する 1 対の 2 kb PFLP 組換え部位の間にある 2 kb プラスミドベクター。

2. 遺伝マーカー-DNA配列を含む請求の範囲第1項記載の2- μ プラスミドベクター。

る。(ii) バクテリア宿主中でのベクターの増殖に必要
なバクテリアプラスミド DNA 配列；(iii) エキストラ 2. μ m
FLP 置換え部位；(iv) 目的とする蛋白質又はペプチドを
コードする DNA 配列；及び細胞変形質転染用の選択マ
ーカー DNA 配列を保持する完全 2. μ m プラスミドであ
つて、2. μ m プラスミドの 2 つの逆方向反復配列の 1
つの配列内の制限酵素部位に上記バクテリアプラスミ
ド DNA が存在し且つ上記エキストラ FLP 置換え部位が
作原されてあり、上記エキストラ FLP 置換え部位は上
記逆方向反復配列の 1 つの配列内の内因性 FLP 置換え
部位に対して同じ方向性を有してあり、上記バクテリア
プラスミド DNA 配列はエキストラ FLP 置換え部位と
上記逆方向反復配列の 1 つの配列内の内因性 FLP 置換
え部位との間にある完全 2. μ m プラスミドを含む請求

の概略第2項記述の2段がリビエとドペタラー。

4. 上記制限解除視点がワークスペース 1 部画である
場合の総括基座座記数の 2 倍であることがわかる。

5. 全てのバクテリア DNA 配列が上記のようである。5' 末端の PLP 結合部位と内因性 PLP 結合部位との間にある順次の配列第 3 項又は第 4 項配列の 2 bp プラズミドバクテリ。

6. 目的とする蛋白質又はペプチドをコードする DNA 配列が酵母が好して発現する誘発剤の能率が高いことから 6 項のいずれか 1 項記載の 2 項プライムドペプチド。

2. 目的とする遺伝質又はペプチドをコードする DNA 配列が、tRNA をコードする DNA 配列であつて、該 DNA 配列はその宿主細胞が酵母において機能する分泌リーダー配列を介して酵母において機能する遺伝子プロモーターと融合しており、その両端が酵母において機能する起停ターミネーションシグナルに融合している請求の範囲第 6 項記載の 2 個のプラスミドベクター。

試 目的とする遺伝子又はペプチドをコードする DNA 配列が、その 5'末端が OAL / CYC133 / OAL / PGK ハイブリッドプロモーターと融合しておりその 3'末端が終位において機能する転写ターミネーションシグナルに融合している GST - HSA 遺伝子である宿主の細菌変異株に導入した。このプラスミドベクター。

9. 目的とする蛋白質又はペプチドをコードする遺伝子が、DEK-遺伝子、あるいは、その近縁遺伝子が酵母において機能する分岐リーダー配列を介して酵母において機能する遺伝子プロモーターに結合しておりその近縁遺伝子が酵母において機能する転写ターミネーションシグナルに結合している *Escherichia coli* の ϕ -ゲルカナーゼをコードする DNA 配列である請求の範囲第1項から第3項のいずれか1項記載の 2 μ プラスミドベクター。

10. 添付した第3図の pBAC3 の配置を実質的に有する請求の範囲第1項記載の 2 μ プラスミドベクター。

11. 請求の範囲第1項から第4項のいずれか1項記載の 2 μ プラスミドベクターの製造法であつて、
(i) 酵母形質転換法を選択するための DNA 配列；(ii) 目的とする蛋白質又はペプチドをコードする DNA 配列；及び (iii) (a) バクテリア内でのベクターの増殖を可能にするバクテリアプラスミド DNA と (b) FLP 複製元部位のエレメントを含む挿入用 DNA 配列を、ホスト細胞 FLP 複製元部位がベクター内に作製され且つ互いに逆の方向性を有する2つの FLP 複製元部位の間に上記バクテリアプラスミド DNA がはさまれるように、挿入用 DNA 配列を完全 2 μ プラスミドに挿入することを含む上記の製造法。

12. 上記挿入用 DNA 配列を内臓型 FLP 複製元部位のユニーク Xba^I 部位に挿入し、該挿入用 DNA 配列の一

方の末端に 2 μ プラスミドの複製配列の一部を有し、他方の末端に 2 μ プラスミドの複製配列の残りの部分を有する請求の範囲第1項記載の製造法。

13. 酵母に対して高価の蛋白質又はペプチドをロードする DNA 配列を有し、バクテリア DNA は含まない 2 μ プラスミドベクター。

14. 請求の範囲第1項から第4項のいずれか1項又は第13項記載の 2 μ プラスミドベクターで形質転換された発酵用酵母又は発酵室用酵母。

15. 請求の範囲第14項記載の酵母を発酵することによつて得られる目的とする蛋白質又はペプチド。

16. 目的とする遺伝子が *Saccharomyces cerevisiae* の細胞内に直接挿入されている 2 μ プラスミドベクター。

明 細 書

酵母ベクター

本発明は、酵母、特に *Saccharomyces cerevisiae* の遺伝子工学に関する。

形質転換と書かれる工程によつて、異種 DNA が酵母細胞に取込まれ、次いで遺伝的に継承されて該 DNA の発現が行なわれる。形質転換についての最初の報告は 1977 年年代の後半に行なわれ、その時の形質転換は、酵母の細胞壁を酵素の作用によつて除いてプロトプラストを得、これに DNA を加える方法を用いるものであつた (Higdon et al., 1977a; Bagg, 1978)。最近ではインダクト酵母細胞を用いた形質転換が証明されている (Higdon et al., 1978)。

酵母は通常 2 μ プラスミドを用いて形質転換することができ、この目的のために通常、"シャトルベクター"として構築されたプラスミドが使用されており、このシャトルベクターは *Escherichia coli* あるいは酵母のいずれにおいても増殖することができる (Higdon et al., 1977a; Bagg, 1978; Strubler et al., 1979)。

pBR 322 (Bolivar, 1978) などの *E. coli* プラスミド DNA 配列が *E. coli* 中に取込まれることによつて *E. coli* 中でのベクター DNA の量産が促進され、そ

の結果酵母の形質転換を効率よく行なうことができる。

酵母形質転換に一般的に使用されているプラスミドベクターは次の2つに大別される。即ち、(i) DNA 複製オリジンを有しているために、クロモソーム DNA に依存することなく自己を維持することが出来る複製ベクター；及び(ii)クロモソーム DNA と組換えを遂にし、宿主細胞中の組換え DNA として複製し自己を維持するインテグレートベクターの2つである。複製ベクターは更に、(a)酵母の同値 2 μ プラスミドから得られる *GENA* 複製オリジンを含む 2 μ 由来プラスミドベクター；(b)酵母のクロモソーム DNA から得られる見掛けの複製オリジンを含む自己複製ベクター；及び(c)上記の DNA 複製オリジンの1つを更にセントロメアを含むことが知られている酵母クロモソーム DNA 配列を有するセントロメアプラスミド (CEM) に分けられる。

上記したベクターで有効な部位を形質転換するためには、組換え DNA を保持する形質転換体を同定して選択することが必要である。この選択は、ベクター DNA 内に識別可能な表現型を有する遺伝子を導入することによつて達成される。実験室で酵母を形質転換するのに使用するベクターの場合には、LEU 2、URA 3、

TRP 1 (Higdon et al., 1977a; Bagg, 1978; Gerbaud et al., 1979) などの原核型遺伝子が通常使われ、これらは宿主の栄養要求性における欠損を補補するように作用する。しかしながら、発酵用

酵母及び他の工業用途に用いられる酵母はしばしば倍數体であるため栄養要求性を見るが、従つて強力な選択因子に属する選択系を利用することが必要である。この点に関連して、各種の耐性を発揮する遺伝子を保持した 2 μ m 由来複製プラスミドベクターが報告されている。即ち、(1) 0.4 μ g (Jinico et al., 1980; Webster et al., 1983)、ハイグロマイシン B (Gritz et al., 1983)、クロラムフェニコール (Cohen et al., 1980; Hedfied et al., 1984) などの抗生物質に対して；及び(2) 敵菌抑制スルホメチオンメチル (Folco et al., 1983)、コンパクチン (Kino et al., 1983)、類 (Hedderon et al., 1985) などの他の毒性物質に対して耐性を発揮する遺伝子を用いた例がある。

酵母中で組換え遺伝子が安定に継承されるか否かは、形質転換に用いた酵母ベクターのタイプに依っている。前記した 2 つのタイプのベクターのうちで安定なベクターはインテグレートベクターである。酵母のインテグレート形質転換の原理及び実験については文献 (Botstein & Davis, 1978; Winkler et al., 1983; Orr - Weaver et al., 1983; Rothstein, 1983) に記載されている。一般にインテグレート形質転換は比較的に効率が低く、菌懸液インテグレートプラスミドの場合には DNA 1 μ g 当り約 1 - 10 個の形質転換体が見られることが報告されている。

プラスミドは細胞 1 個当り 1 又は 2 コピーの割合で存在し (Clarke & Carbon, 1978)、1 世代当りわずかに 1 % が失われるにすぎない (Walmsley et al., 1983)。キメラ 2 μ m 由来プラスミドは、宿主の株及び該プラスミド中に存在する 2 μ m DNA 配列に依つて異なる程度の遺伝的安定性を示す。

2 μ m プラスミドは細胞の核に存在していることが知られている (Nelson & Fagardo, 1977; Livingston & Hane, 1977; Selig et al., 1980; Takei et al., 1980; Sigurdson et al., 1981) が、メンデルの方法のように遺伝されない (Livingston, 1977)。2 μ m プラスミドを持たない細胞 (strain) が、細胞 1 当り 2 μ m プラスミドの平均コピー数が 50 である半数体酵母集団から 1 世代当り 0.001 % - 0.01 % の割合で発生することが示されている (Fletcher & Cox, 1983)。このような低レベルの遺伝的不安定性の原因を説明するものとして、2 μ m プラスミドは通常の成長条件下で細胞に対して何らの利点を有していないことが考えられる (Broach, 1981; Fletcher & Cox, 1983; Sigurdson et al., 1981)。しかしながら、2 μ m プラスミドを有している株について 2 μ m プラスミドが成長速度に対してわずかながら効果を示していることが報告されている (Walmsley et al., 1983)。S. cerevisiae の各種の株を分析した所、発酵用酵母

(Winkler et al., 1977; Hicks et al., 1979) にもかかわらず、酵母クロモソーム DNA と相同性を有するフリー末端を持つ線状 DNA は高い効率 (100 - 1000 倍) で酵母を形質転換し、形質転換に用いた DNA は一般に複製部位に対して相同性を有する配列中に組み込まれる (Orr - Weaver et al., 1981)。従つて、適切な制限酵素を用いてベクター DNA を切断することによつて、形質転換の効率を高め、クロモソームのインテグレート部位を定めることが可能である。形質転換の効率が十分に高く、かつクロモソーム内に組み込まれるターゲット DNA 配列が、宿主細胞の代償に必須の遺伝子内に組み込まれない場合には、発酵用酵母の遺伝子的モディファイケーションにインテグレート形質転換を用いることができる。最近、発酵用酵母に用いるインテグレート酵母ベクターについて報告されている (Yocum, 1985)。

インテグレートベクターは選択を受けずに遺伝的に高率に変化に継承されるが、複製ベクターはこれとは相反して不安定である。遺伝的に継承される変異性は用いる複製ベクターのタイプに依る。ARS プラスミドは高コピー数で存在し (細胞 1 個当り約 20 - 50 コピー)、より安定した傾向にあるが、1 世代当り約 10 % 以上の頻度で失われる (Skolnick, 1983)。しかしながら、ARS プラスミドの安定性はセントロメアが結合することによつて上昇する。セントロメア

(Tubb, 1980; Aigle et al., 1984; Hinchcliffe & Daubney, 1986) などの酵母のほとんどの株に 2 μ m プラスミドが存在していることが報告されている (Clark - Walker & Miklos, 1974)。従つて、2 μ m プラスミドは常に存在しており、このことが本質的に高率の遺伝的安定性を有していることを示していると考えられている。

2 μ m プラスミドについての遺伝子分析及び分子分解の結果、2 μ m プラスミドの複製及び安定性に関して多くの情報が得られている (Volker & Broach, 1987)。本発明にはこのプラスミドは 6318 塩基対の環状 DNA 分子からなっている (Rattley & Develson, 1980)。そしてこのプラスミドはユニークな二方向性の DNA 複製オリジンを有しており (Newlon et al., 1981)、これがすべての 2 μ m 由来ベクターの必須成分となつている。2 μ m プラスミドは 4 つの遺伝子、即ち REP 1, REP 2, REP 3 及び FLP を含んでおり、これらが細胞 1 個当りのコピー数を高く安定に維持するために必須とされている。REP 1 と REP 2 遺伝子はトランス作用蛋白質をコードしており、この蛋白質は、REP 3 遺伝子座と相互に作用して協同して複製を誘導し、細胞分裂の際に 2 μ m プラスミドの分割が安定に行なわれるのを可能ならしめていると考えられている (Volker & Broach, 1987)。この点に関して、REP 3 遺伝子は、2 μ m プラスミド

の安定な分解を行なうレシ作用遺伝子座として作用しており、 ϕ モザイクセントロメアと類似の装束型を有している(Jepson et al., 1983; Kikuchi, 1983)。2 μ m プラスミドの重要な特徴は、2つの逆方向反復DNA配列(それぞれ559塩基対)が存在することであり、この配列によって環状分子が2つのユニーク領域に分割されている。逆方向反復DNA配列の間で分子内組換えが起こり、一方のユニーク領域が他のユニーク領域に対して逆方向となり、A及びBと呼ばれるプラスミドの構造異性体が生じて *in vivo* で2つの異性体を有する混合集団が産生される(Beggs, 1978)。2つの逆方向反復配列間での組換えは、FLPと言われる遺伝子の産生蛋白質によって仲介され、FLP蛋白質が逆方向反復領域内での高頻度の組換えを仲介することができる。この部位特異的組換えによって、プラスミドコピー数の増幅が実現されていると考えられている(Fitcher, 1986; Volkert & Breach, 1986; Som et al., 1988; Murray et al., 1987)。

それぞれの逆方向反復配列は、3つのDNA反復配列サブユニット(第3図に三角形で示されている)を含んでおり、そのうちの2つの隣接サブユニットはお互いに同じ方向性を有しており、他1つのサブユニットは逆方向であつて8塩基対結合又はスパーサー領域を介して他の2つのサブユニットのうちの1つに結合し

ている。このスパーサー領域はユニークXba I 部位を有しており、FLP遺伝子の生成物を認識しそしてその生成物によってその末端が切断される。それに関連している配列は、他の逆方向反復配列に対応する配列に対して相同性を有しており、従つて末端が切断された後に正確に組換えが行なわれる。Andrewsらによつて、8 b.p. スパーサー領域を含む74塩基対の配列がFLP部位特異的組換えには最低必要であることが見出された(Andrews et al., 1985)。

2 μ m プラスミドの複製系に基づいた酵母ベクターは、2 μ m プラスミドの複製に必要な領域に異種DNA配列を挿入することによつて構築される(Beggs, 1981)。このようなベクターには基本的に2つのタイプがある。即ち、(i)全2 μ m ベクター及び(ii)2 μ m オリジンベクターである。前者の場合には、2 μ m ベクターの全てを有しており、そこに*2.0* μ m プラスミドDNAなどの各種の異種配列が挿入されている。このように挿入されたプラスミドは、*Cir⁺* (2 μ m 含有)及び*Cir⁻* (2 μ m 欠損)宿主のいずれにおいても、高い遺伝的安定性を有しており高いコピー数で維持される。他方後者の2 μ m オリジンベクターは、通常、2 μ m のDNA複製オリジンと2 μ m の599塩基対反復配列のシングルコピーを有する最少DNA配列を持つのみであつて、このようなベクターは*Cir⁺* 宿主株でしか維持できない。何故なら、安定に維持されるためには、

これらのベクターは、内因性のプラスミドのREP 1及びREP 2遺伝子によつてコードされる蛋白質をトランス作用蛋白質として用いる必要があるためである。

異種遺伝子を発現して商業的に重要なポリペプチドを高レベルで産出することのできる遺伝子的に修正された酵母を構築する場合には、通常、高コピー数の酵母ベクターを選択することが望ましい。2 μ m 由来ベクターは発現プラスミドとして用いるには非常に好適であることが証明されており、今日ではしばしば2 μ m 由来ベクターが用いられている(Kingsman et al., 1985)。

欧州特許出願第8630303号、1(公開番号0201237A1、出願人ゲルマ・バイオテクノロジーLtd)には、最初のビール発酵時期には異種遺伝子の発現が起こらず、酵母の量が蓄積されその後ビールから酵母を取り出すと異種蛋白質の合成が誘導されるように、工業用酵母株を遺伝子的に修正して発酵用酵母中で異種蛋白質を産生する方法が記載されている。かかる方法は、強力な選択マーカーDUP-1と修正した血清蛋白膜H-メチオニルアラジニン(Met-HRA)をコードする遺伝子とを有する2 μ m 由来ベクターであつて該蛋白質の発現がガラクトース誘導プロモーターによつて転写レベルで誘導されているベクターで、発酵用酵母を形質転換することによつて達成される。上記の方法の実施期間中に、異種蛋白質の合成収量を

最大にするためには次のことを実施するのが必要である。即ち、(i)発現される遺伝子(Met-HRAをコードする)の高コピー数；(ii)非選択的な培養条件下において目的とする遺伝子の遺伝的安定性が高いこと；(iii)発酵用酵母に導入される組換え遺伝子は、酵母及び該酵母のビール並びに異種蛋白質の生産能に有害な効果を与えないこと；及び(iv)発酵中に存在する組換え遺伝子は、出来る限り、目的する遺伝子及びそれに隣接する調節遺伝子に属すべきであること、である。上記図は特に重要であり、通常の発酵用酵母の培養メディアウム、即ちポンプが添加された麦芽抽出物に銅イオンなどの毒性物質を添加することは望ましくなくまた実用でない。銅イオンを添加する場合には、工程コストが上昇し、第1の発酵生産物であるビールの質に有害で許容し得ない効果を与えることになる。上記図に関しては、遺伝子的に修正された酵母は、組換えプラスミドのベクテリア由来の配列部分に超陽する配列などの余分なDNA配列を有していないのが望ましい。

本発明者の出願であつてEP-A-251744として公開された明細書には、目的するDNA配列を含有する相溶性2 μ m プラスミドDNA配列の2つのコピーが同じ方向性を有しているインテグレートベクターを構築し、このベクターで酵母を形質転換し、次いで得られる形質転換酵母から、目的とするDNA配列が取出されて修正された内因性2 μ m プラスミドを保持する

細胞を単離することによつて、内因性 2 μ m プラスミドを目的とする蛋白質又はペプチドをコードする DNA 配列を導入して、酵母細胞を修正する方法が記載されている。インテグレイトベクター自体は、形質転換酵母細胞中で存続できない。相同性 2 μ m プラスミド DNA 配列は、通常はそうではないが、2 μ m プラスミド反復配列のコピーであつてもよい。

本発明者は、修正された 2 μ m プラスミドを導入することによつて酵母細胞を形質転換することのできる、上記細胞中に記載された方法の長短を見出した。

本発明の方法では、使用するプラスミドベクターは、2つの同じ方向性を有している相同性 2 μ m プラスミド DNA FLP 組換え部位の間に導入されているバクテリヤ中でのベクターの増殖を可能にする DNA 配列、目的とする蛋白質又はペプチドをコードする DNA 配列であつて必ずしも必要ではないが好ましくは酵母に肉して繁殖の DNA 配列、及び好ましくは選択マーカー DNA 配列を含むベクターである。本発明の 2 μ m プラスミドベクターは、FLP 組換え部位の3つのコピーを有しており、そのうちの2つは同じ方向性を有しており、他の2つは逆の方向性を有している。このような構成を有するプラスミドベクターで酵母を形質転換すると、バクテリヤ中でのベクターの増殖を可能にする DNA 配列は自然に失われ、プラスミドベクターは、形質転換酵母の内因性 2 μ m プラスミドと置換し得る修正 2 μ m プラスミド

となる。この種のプラスミドベクターを以後ダイスイントグレイションベクターという。このようなベクターで形質転換された酵母は、目的とする遺伝子を含みバクテリヤ DNA は含まない修正 2 μ m プラスミドの多数の染色体外コピーを有しており、これらは非選択的生育条件下において遺伝的に安定に継承されることが見出されている。

1984年秋の第13回目の「酵母遺伝子及び分子生物学」についてのコンファレンスで、Bruschi は、2 μ m 由来プラスミドの組換えによつてバクテリヤ DNA 配列が融合されることを報告したが、それは、その系が DNA 分子の構造と機能との関係を研究するのに用いることができることを示唆したにすぎない。本発明者は、同様の系が、予期せぬ安定性を有する有利な発現ベクターの構築に用いることができることを見出した。

本明細書で用いる「FLP 組換え部位」とは、FLP 遺伝子生産物との相互作用の結果、組換えが可能な部位のいずれをも意味する。もし Andrew らの知見(1985)が正しいならば、FLP 組換え部位は、通常彼らによつて同定された 74 b.p 配列をその最少配列として有している。実際は、全反復配列の 599 塩基対以上を含んでゐたとしても何んらの特異もない。

本発明の 2 μ m 由来ダイスイントグレイションベクターは、実験室及び工業用のいずれの酵母も形質転換できるとことが見出された。このベクターは、細胞1個当たり高コピー数で維持され且つ非常に高い遺伝的安定性を有している。更に、これまで報告されている他の 2 μ m 由来ベクターと異なつて、本発明のダイスイントグレイションベクターは、酵母が形質転換される際に、バクテリヤプラスミド DNA 配列が自然に除去されるように構築されている。かくして、2 μ m プラスミドに導入された目的とする遺伝子が、非選択的生育条件下においても必ずしもバクテリヤプラスミド DNA 配列が存在することなく細胞1個当たりのコピー数が高い状態で維持される発酵用酵母の遺伝子的修正が構築できる。このようなベクターを用いて遺伝子的に修正された発酵用酵母を構築することにより、目的とする遺伝子のみが発酵用酵母の次の世代まで安定に維持され、これによつて、付加的な DNA 配列が酵母の繁殖及び/又は酵母によつて産生される製品の香り並びに清澄に与える有害な効果を除去できる。

実際には、目的とする遺伝子はいずれの組換え遺伝子であつてもよく、また酵母に対して異種のもので同種のものでよい。本発明のダイスイントグレイションベクターは例えば、発酵用酵母に *Met*⁻ *URA* 遺伝子を安定にインテグレートするに用いることができ、この遺伝子は、例えば *EP-A-201239* 号明細

書に記載された方法に従つてホスホグリセレートキナーゼプロモーター (PGK) により、あるいは例えば *EP-A-201239* 号明細書に記載された *GAL10* / *CYC1* ハイブリッドプロモーターあるいは *EP-A-258067* 号明細書に記載された *GAL* / *PGK* プロモーターなどの調節可能なプロモーターによつて発現される。

本発明の系によつて安定に維持される付加的な遺伝子は、例えば、発酵用酵母での細胞外グルコアミラーゼ酵素の産生を規定する *Saccharomyces diastaticus* の *DGX1* 遺伝子、発酵用酵母でのエンド-1,2-1,4- β -グルコナーゼの産生を規定する *Bacillus subtilis* の *B*-グルコナーゼ遺伝子 (Hinchliff & Box, 1985) などである。このような遺伝子は、遺伝子の発現レベルをコントロールし及び/又は遺伝子によつて産生される蛋白質が発酵用酵母から分泌されるように、最初任意遺伝的に修正することができる。

本発明の新しいダイスイントグレイションベクターは、*EP-A-201239* 号明細書に記載された工程に用いるのが特に有利である。なぜなら、この工程によれば、目的とする遺伝子は酵母の発酵の間は発現されずまた酵母の通常の生育条件下でも発現されず、発酵後の工程で発現されるように調節されているためである。従つて、目的とする遺伝子の高レベル発現の

時期と、細胞増殖によつて酵母のバイオマスが合成される時期とが分離されており、これによつて、プラスミド安定性に及ぼす遺伝子発現の影響を最少にすることが出来る。

本発明のベクターは、(i)バクテリア宿主中でこの当該ベクターの増殖に必要なバクテリアプラスミドDNA配列；(ii)エキストラ 2 μm FLP 組換え部位；(iii)目的とする蛋白質又はペプチドをコードするDNA配列；及び(iv)酵母形質転換用の選択マーカーDNA配列を有する完全2 μm プラスミドを含むダイスインテグレーションベクター（前記定義の通り）であつて、2 μm プラスミドの2つの逆方向反復配列の1つの配列内の制限酵素部位に該バクテリアプラスミドDNA配列が挿入し且つ該エキストラ 2 μm FLP 組換え部位が作製されており、該逆方向反復配列の1つの配列内の内因性FLP組換え部位に別して同じ方向性を有して該エキストラFLP組換え部位が存在しており、該エキストラFLP組換え部位と該逆方向反復配列の1つの配列内の内因性FLP組換え部位との間に該バクテリアプラスミドDNA配列がはさまれているダイスインテグレーションベクターが好ましい。

このような本発明の好ましいダイスインテグレーションベクターは、1つもしくはそれ以上のバクテリアプラスミドDNA配列と、2 μm プラスミドから得られる74塩基対FLP組換え部位のエキストラコピーとが

とことから、本発明のベクターは完全2 μm プラスミドに西づくのが好ましい。しかしながら、本発明のベクターが内因性2 μm プラスミドと共に存在する場合に、該ベクター中にないREP 1, REP 2, REP 3, FLPなどの遺伝子は、これら遺伝子の産物であるトランス作用蛋白質として供給される。これらのすべては複製のオリジンに必要なものである。

以下に詳述するように、バクテリアDNA配列を有する挿入用DNA配列は、そのそれぞれの末端に反復配列のそれぞれの部分を保持していてもよく、この場合又は該挿入用DNA配列は、内因性組換え部位が該挿入されて得た2つの新しいFLP組換え部位が形成されるように内因性反復配列内に挿入され、このFLP組換え部位はそれぞれ内因性組換え部位と挿入された挿入用DNAの相補的部分とからなっている。あるいはまた、完全なFLP組換え部位を挿入用DNA配列の一端に導入し、次いで得られるDNA配列を、バクテリアDNA配列が内因性反復配列と挿入用反復配列との間に存在するように、内因性反復配列に隣接して又は嵌れて挿入される。挿入用DNA配列が、内因性反復配列から離れた位置に挿入される場合には、内因性反復配列と挿入された反復DNA配列との間の内因性DNA配列はバクテリアDNA配列とともに除去される。従つてこのDNA配列が必要な場合には、挿入用反復配列の内因性反復配列から離れた別にく好ましくは挿入されるDNA配列上に

挿入された完全2 μm プラスミドからなる。更には、酵母形質転換用の選択マーカー例えばCUP-1と共に該中に並んだ目的とする遺伝子が、2 μm プラスミドの第2の部位に挿入されている。バクテリアプラスミドDNA配列と酵母DNA反復配列とが、完全2 μm プラスミドの2つの逆方向反復配列の1つのコピー内の例えばXba I 部位に挿入されている。DNA反復配列の正しい方向は、プラスミドの機能に必須であり、例えばB, coliでの増殖に必要なバクテリアプラスミド配列は、2 μm プラスミドのFLP組換え部位の同じ方向性を有する2つのコピーの間には置かれるようにプラスミドが複製される。DNA配列の配置は、第3図に詳しく説明されている。このように複製することによつて、プラスミドを酵母に導入した時に2つの同じ方向性を有するDNA反復配列の間で生じる部位特異的組換えによりプラスミドから除かれるようなDNAの領域内に、バクテリアプラスミドDNA配列を配置することが出来る。この部位特異的組換えは、2 μm プラスミドのFLP遺伝子産物によつて仲介され、この産物は、*cir+*細胞を形質転換した場合には酵母の内因性2 μm プラスミドによつて供給され、*cir-*細胞を形質転換した場合にはダイスインテグレーションベクター自身によつて供給される。本発明のベクターは、形質転換酵母の内因性2 μm プラスミドを補うのに供用することができ、また組換えは*cir-*細胞の方が速く起こる

更にこのDNA配列の1つのコピーを置く必要がある。

目的とする遺伝子を挿入するインテグラル2 μm プラスミドの部位は、該挿入によるプラスミドコピー数及び遺伝的安定性への効果が最少になるように選択される。従つて、REP 1, REP 2, REP 3及びFLP遺伝子に対して害を与えないような部位が目的とする遺伝子を挿入するのが好ましく、特に、プラスミドを原核の*cir-*細胞株の形質転換に用いる場合にはそのようにするのが好ましい。

本発明のダイスインテグレーションベクターの1つの有利な特徴点は、それを*cir+*酵母株に導入した場合にはそれがインテグラル2 μm プラスミドを有しているためにバクテリアプラスミド配列が除去される間または除去された後にそれが内因性2 μm プラスミドを補うことができることである。同様の状態については酵母の*cir+*細胞株に導入された完全2 μm ベクターについても報告されている(Harford & Petern, 1987)。本発明のダイスインテグレーションベクターは、酵母株の内因性2 μm プラスミドを補うために用いることもできる。

添付した図面においては以下のことが示されている。

図1図は、プラスミドpDA 112 (Anders, et al., 1985)を示す。細い線は、バクテリアプラスミドpUC 9から誘導されるDNA配列を示し、太い黒線の図には、FLP組換え部位を含む74塩基対DNAフラグメ

ントを示し、三角形は、それぞれのFLP交換部位内の3つの内部DNA反復配列の方向を示す(Andrews, et al., 1985)。

第2図は、プラスミドpSAC 112を示す。プラスミドpSAC 112は、BamHI, SalI及びHindIII部位が除かれている以外はpEA 112と同じである。

第3図は、プラスミドpSAC 3を示す。太い線は、バクテリアプラスミドpUC9のDNA配列を示し、太い点線の図は、FLP交換部位を含む74塩基対DNAフラグメントを示し、細い線は2 kbプラスミドDNA配列を示し、三角形は、それぞれのFLP交換部位内の3つの内部DNA反復配列の方向を示す。

第4図は、プラスミドpSAC 3U1を示し、記号は第3図と同じである。

第5図は、pSAC 3U2のプラスミドマップを示し、記号は第3図と同じである。

第6図は、pSAC 3U0のプラスミドマップを示し、記号は第3図と同じである。

第7図は、pSAC 310のプラスミドマップを示し、記号は第3図と同じである。

第8図は、pSAC 301のプラスミドマップを示し、記号は第3図と同じである。

第9図は、半数体酵母の生育を示す実験に要した図面であり、URA3及びバクテリアbla遺伝子の遺伝的安定性を示す。

XbaIで開裂したpSAC 112に連結した。連結して得られるDNAをE. coli株AG1(NEL Enzymes Ltd., Crawlington, Englandから入手した)に導入した。得られるアムピシリン耐性の形質転換体について、プラスミドpJF92(Storms, R.K. et al., 1977)から得た32Pラベル化2.2 kb塩基対EcoRIフラグメントとのコロニーハイブリダイゼーションにより(GrubsteinとKosness, 1975)、2 kbプラスミドに対する相同性をスクリーニングした。2 kbプラスミドに特異的にDNAプローブに対して相同性を示すコロニーを単離し、そのプラスミドDNAを制限酵素マッピング法により特章付けた。かくしてプラスミドpSAC 3を得た。

プラスミドpSAC 3を制限酵素PstIで開裂すると、Kによって、プラスミドpSAC 3U1(第4図)及びpSAC 3U2(第5図)を構築した。線状DNAを、0.3 mM dNTP(dATP, dTTP, dCTP及びdGTP)の存在下で37℃で10分間、T₄ DNAポリメラーゼで処理してプラント末端とした。DNAをフェノール：クロロホルムで抽出し、リゲーションを行なう前にエタノール沈殿付した。プラスミドpJF91(0)(Sage, 1981)を、制限酵素HindIIIで消化し、DNAフラグメントを1 kbゲルのアガロースゲル電気泳動に付した。酵母のURA3遺伝子を有する1.1 kb塩基対DNAフラグメントをゲルから単離し(Moniasis, et al.,

第10図は、32Pでラベル化したpSAC 3 DNAでプローブした全酵母DNAのオートラジオグラフィーを示す。

以下に、本発明を実施例により説明する。

実施例1

プラスミドの構築

プラスミドpSAC 112(第1図, Andrews, et al., 1985)を、制限酵素BamHI及びHindIIIで同時に消化することによってプラスミドpSAC 112(第2図)を構築した。線状プラスミドDNAを、0.3 mM dNTP(dATP, dTTP, dCTP, 及びdGTP)の存在下で37℃で10分間、DNAポリメラーゼI(クレンロー)で処理した。DNAをフェノール：クロロホルムで抽出し、エタノール沈殿し、次いでT₄ DNAリガーゼの存在下で15℃で1晩インキュベートした。連結されたDNAをE. coli株X01061(CasadabanとCohen, 1980)に導入し、得られる形質転換体からプラスミドpSAC 112を単離し、BirnboimとDoly(1980)の方法によって同定し特章付けを行なった。

以下のようにしてプラスミドpSAC 3(第3図)を構築した。Guerinneau, et al., (1974)に記載された方法と同様にしてBRI株から、酵母2 kbプラスミドDNAを単離した。複製した2 kbプラスミドDNAを、Moniasis, et al., (1982)に記載された方法と同様にして、制限酵素XbaIで部分消化し、

1982)、0.3 mM dNTP(dATP, dTTP, dCTP及びdGTP)の存在下でDNAポリメラーゼI(クレンロー)で処理した。1.1 kb塩基対HindIIIフラグメントをフェノール：クロロホルムで抽出し、エタノール沈殿に付し、上記で開裂した線状pSAC 3 DNAとプラント末端で連結した。得られる連結DNAをE. coli株AG1に導入した。得られるアムピシリン耐性形質転換体について、プラスミドpJF91(0)から複製される1.1 kb塩基対HindIIIフラグメントの32Pラベル体を用いたコロニーハイブリダイゼーションにより(GrubsteinとKosness, 1975)、URA3遺伝子に対する相同性をスクリーニングした。URA3遺伝子プローブに対して相同性を示すコロニーから、プラスミドpSAC 3U1(第4図)及びpSAC 3U2(第5図)を単離した。また、URA3遺伝子を含む1.1 kb塩基対HindIII DNAフラグメントを、pSAC 3のユニークSacI部位及びSnaBI部位にプラント末端で連結して、pSAC 3U0(第6図)及びpSAC 310(第7図)と命名されたプラスミドをそれぞれ得た。

プラスミドpST13:1(Henderson, et al., 1985)から得られるCUP1遺伝子を保持する694塩基対XbaI・KpnI DNAフラグメントを、pSAC 3のユニークPstI部位へプラント末端で連結することによって、プラスミドpSAC 301(第8図)を構築した。

プラスミド pSAC 3U1 及び pSAC 3U2 よりなる酵母の形質転換

ダイスインテグレーションベクター pSAC 3U1 (第4図) 及び pSAC 3U2 (第5図) は、2 μ m 3 フォームのユークタ *Pst*I 部位に挿入された選択酵母遺伝子 URA⁺ をそれぞれ含むように構築されている。更にはそれぞれのプラスミドは、同じ方向性を有する FLP 組換え部位の2つのロビーに接しているバクテリアプラスミド pUC9 から得られる DNA 配列を保持している。pUC9 DNA の位置は、これらの同じ方向性を有する2つの FLP 組換え部位の間での FLP を介しての組換えが起これ、その結果、酵母の形質転換の際にバクテリアプラスミド DNA が除去されるような位置にある。Lio (1988) の方法に従って、プラスミド pSAC 3U1 及び pSAC 3U2 で、半親体酵母株 S 150 - 2 の *cir*⁺ 及び *cir*⁰ 酵母株 (Cashmore, et al., 1986) を形質転換してクラシル原株菌株とした。得られる URA⁺ 形質転換体について、Chevalier と Aigle (1979) の方法により、酵母での *P*-ラクトラム特異的酵素 *P*-ラクトマーゼをコードするバクテリア *bla* 遺伝子の遺伝的適合性をスクリーニングした。第9図にその結果が示されており、それによれば、両者のプラスミドは、全ての *cir*⁰ 株の形質転換体において URA⁺ 遺伝子から *bla* 遺伝子を分離 (*segregate*) しており、酵母の形質転換の際に、プラスミドからバクテリア DNA 配列が

除去されたことを示している。しかしながら、*cir*⁺ 株の URA⁺ 形質転換体の大部分については、*bla* 遺伝子が遺伝的に継承されていることが観察された (pSAC 3U1 については2りのうち1株、pSAC 3U2 については2りのうち1株)。これらのデータから、プラスミドの分解、即ち FLP によるバクテリアプラスミド DNA 配列の除去は、*cir*⁺ 株よりも *cir*⁰ 株の形質転換の際により多く起これることが示されている。

形質転換後の分子分析

bla 遺伝子を分離した URA⁺ 形質転換体 (即ち、*P*-ラクトマーゼ・ネガティブ・クローン、*bla*⁻) が、実際に *bla* 遺伝子とそれに隣接したバクテリアプラスミド DNA 配列を失っているか否かを調べるために、酵母 DNA を分析した。pSAC 3U1 又は pSAC 3U2 で形質転換された *cir*⁺ 及び *cir*⁰ 株の2つの URA⁺ *bla*⁻ 形質転換体を、クラシルを含む選択最少増殖で培養せしめて、以下に示す方法でその全 DNA を抽出した。よく洗浄した細胞を採取し、それらを、ミムルビトール、0.025 M エチレンジアミンテトラ酢酸 (EDTA) pH 8.0、80 μ g/ml ジチオスレイトールの3%に28℃で15分間再懸濁した。次いで、細胞を採取し、1.2 M ソルビトール、0.1 M グエン酸ナトリウム、0.01 M EDTA pH 5.8、0.025 μ g/ml ゲイモリアーゼ (カリニウム, Co. Ltd) の3%に28℃で、プロトプラストが得られるまで再懸濁した。得られるプロトプ

ラストを、1.2 M ソルビトールでも回洗後し、34サトルコシル、0.3 M トリス/HCl pH 7.5、0.2 M EDTA、100 μ g/ml プロテインアーゼ K の1%に55℃で60分間再懸濁した。クロモホルム：イソプロパノール、フェノール、クロロホルム、次いでエーテルで DNA 精製物を抽出し、10 mM トリス/HCl、1 mM EDTA pH 8 に対して重析した。酵母全 DNA を、制限酵素 *Eco*R I、*Xba*I 及び *Pst*I で消化し、得られる DNA フラグメントをアガロース電気泳動で分離した。サザントランスファ- (Maniatis, et al., 1982) に従い、酵母全 DNA を ³²P ラベル化 pSAC 3 DNA のハイブリダイズさせた。その結果は第10図に示されており、第10図は、³²P ラベル化 pSAC 3 DNA でプロブされた酵母全 DNA のオートラジオグラフーを示している。プラスミド pSAC 3U1 又は pSAC 3U2 で形質転換された S 150 - 2 の *cir*⁺ 株から DNA を単離した。それぞれの株/プラスミドの組合わせの2つの形質転換体を入、B と命名し、それらを分析した。DNA は次のように制限酵素で消化した。

*Xba*I : トランク 1 - 4 及び 21 - 24
*Pst*I : トランク 5 - 12
*Eco*R I : トランク 13 - 20。

トランク	プラスミド	<i>cir</i> ⁺ / <i>cir</i> ⁰	菌株 (A/B)
6, 14, 22	pSAC 3U1	<i>cir</i> ⁺	A
8, 16, 24	pSAC 3U1	<i>cir</i> ⁺	B
5, 13, 21	pSAC 3U1	<i>cir</i> ⁰	A
7, 15, 23	pSAC 3U1	<i>cir</i> ⁰	B
2, 10, 18	pSAC 3U2	<i>cir</i> ⁺	A
4, 12, 20	pSAC 3U2	<i>cir</i> ⁺	B
1, 9, 17	pSAC 3U2	<i>cir</i> ⁰	A
3, 11, 19	pSAC 3U2	<i>cir</i> ⁰	B

酵母の内節に2 μ m プラスミドに存在する公知の制限酵素部位 (Bartley と Donelson, 1980) 及び組換えプラスミド pSAC 3U1 及び pSAC 3U2 に基づき、プラスミド pSAC 3 に対するハイブリダイゼーションパターンを予想することが出来る。予想されるハイブリダイゼーションパターンを表1に示した。

表 1

pSAC301 及び pSAC302 で形質転換された S150-2Dcir⁺と
cir⁰酵母株の pSAC3 に対するハイブリダイゼーションパター

プラスミド DNA	制限酵素フラグメント (ナノ塩基対)			
	NotI	XbaI	PstI	
2 μm (内因性)	4.1 5.9 2.4 2.2	3.2 3.1	6.3	
pSAC301 及び pSAC302 (インデント)	5.3 4.1 0.72	4.3 3.2 2.8	10.2	
pSAC301 及び pSAC302 (分解した)	(5.0) 4.1 3.3 (2.4)	4.3 3.2	7.4	

全ての場合において、それらの実験型が失われてい
ることが観察された。即ち、pSAC300 及び pSAC310 は
酵母の形質転換の際にバクテリアプラスミド DNA を除去
することができる。この点に関して、プラスミド
pSAC300 の場合には、S150-2B の cir⁺ 酵母株の
ble⁺ 形質転換体が発生に高い比率で生じることが観
察された。このことについてはどのように説明すべき
かは判らない。しかしながら、次の可能性がある。即
ち、pSAC300 に URA3 遺伝子が挿入されたことによつ
て His⁺ 細胞がとられ、競争している FLV 遺伝子の発
現が阻害を受け、その結果 FLV レコンビナーゼの発現
が高くなった可能性がある。

プラスミド pSAC301 を、顕微鏡性工業用酵母、勝成
発酵用酵母の形質転換に用いることを考えた。即ち、
Hisonobu と Daubney (1986) に記載されている
Pass 7 酵母株 (P-11) を pSAC301 で形
質転換した。次いで、得られる細胞形質転換体につ
いて、マウス細胞に接合してマウス細胞より ble⁺
株が得られるかを調べた。テストした
形質転換体の約 1/10 が ble⁺ 細胞性を示し、このこ
とは、発酵用酵母株においてプラスミド pSAC301 の
in vivo 分解が起ったことを示している。

プラスミド pSAC300、pSAC310 及び pSAC301 の in
vivo 分解について、実験型が失われた適当な宿主
株の分子上の複製機構を十分に研究することによつて分

明となる。即ち、プラスミドが
FLV による内部切除を受けた場合に生じるフラグメン
トを示すものである。

ハイブリダイゼーションの結果 (図 10) とその
予想 (表 1) とを比較すると、それぞれの形質転換体
において、同じ方向を有する FLV 転換元部位内にある
バクテリアプラスミド DNA 配列の除去に相当する欠失
を認識しプラスミドが変化したことが判る。更には、
pSAC302 / B と融合された形質転換体の場合には、S
150-2B 株の内因性 2 μm プラスミドはほぼ全
く存在していない。このことは、プラスミド pSAC302 で
cir⁺ が形質転換されることによつて内因性 2 μm プラ
スミドが除去されたことを示している。

更に、プラスミド pSAC301 と pSAC302 が酵母の形質
転換の際にバクテリアプラスミド DNA 配列の除去を
受けたことは、³²P-PCR DNA (Vieira と
Messing, 1982) に対する上記した DNA 試薬物の
ハイブリダイゼーションからも明らかである。URA⁺
ble⁺ 形質転換体は、この DNA プローブに対してハイ
ブリダイズしなかった。

酵母形質転換の際のプラスミド pSAC300、pSAC310 及び pSAC301 の分解

URA⁺ プラスミド pSAC300 及び pSAC310 を用いて、
S150-2B の cir⁺ 及び cir⁰ 酵母株を形質転換し、
得られる形質転換体の URA 及び ble 発現を調べた。

解が生じていることを確認した。即ち、上記した
³²P-PCR DNA に対して酵母全 DNA をハイブリダイズ
させた所、ble⁺ 酵母株については何人らの相同性も
検出されなかった。

“分選”形質転換の際のプラスミド安定性

pSAC301、pSAC302、pSAC300 及び pSAC310 の分解
されたプラスミド酵母株を保持する S150-2B の
cir⁺ 及び cir⁰ 株における URA⁺ 実験型の遺伝的安定
性を、2 株 W/V グルコースを含む YPD 中で無選択的に酵
母を生産せしめ、同じ最少培地にプレートし、
ウラシルを欠いた最少培地にプレートすることによつて調べた。
1 世代毎のプラスミド欠損パーセントを計算し、表 2 に示した。

表 2

1 世代毎のプラスミド欠損パーセント

プラスミド株 (分選されたベクター)	1 世代毎のプラスミド欠損パーセント	
	S150-2B cir ⁺	S150-2B cir ⁰
pSAC301	0.22	0.19
pSAC302	0.31	0.14
pSAC300	2.5	-
pSAC310	0	0.89

表2の結果から判るように、すべての分解された (ダイミントグレートされた) ペクターは、 8150 ± 25 の cir^+ 及び cir^0 誘導体株中で不安定である。しかしながら、特に pSAC3U1、pSAC3U2 及び pSAC3I0 の不安定性のレベルは、 8150 ± 25 中の他の URA⁺ 2 μ m 複製型ペクター (Sealcoats, es el., 1986) よりも少なくともワンオーダー低い。

pSAC3 の 2 μ m プラスミド部分のユニーク Eco I 部位に URA 3 遺伝子を挿入することによつて、pSAC3U1、pSAC3U2 及び pSAC3I0 から新導される分解されたプラスミド誘導体よりも安定性が低い分解されたプラスミド誘導体が得られることは注目される。従つて、選択マーカーの挿入部位が、得られる分解されたプラスミド誘導体の安定性に対して大きな効果を与えることが明らかである。この点に就いて、2 μ m プラスミドのユニーク Sma III 及び Pst I 部位が複製型遺伝子の導入に用いた遺伝子組を形成することが明らかである。何故なら、このような部位への導入によつてプラスミドの安定性が影響を受けるからである。

発酵用酵母の“分解”形質転換体でのプラスミド安定性

SB 1 1.0 の pSAC3C1 形質転換体の分解されたプラスミド誘導体を有する分形形質転換体について、細胞世代複製の安定性を調べた。上記したと同様にしてプ

ラスミド安定性の実験を行つた所、非選択的培養条件下で1世代当り0.014%のプラスミド欠損が観察された。この結果から、pSAC3C1 の分解されたプラスミド誘導体は発酵用酵母株 SB 1 1.0 中で非常に安定であり、細胞え2 μ m 複製型ペクターについてこれまで観察されたことのない程度の安定性を有している。

酵母中で目的とする遺伝子を安定に維持するためにダイミントグレイションペクターを低発すること

プラスミド pSAC3 はユニーク Pst I 部位及びユニーク Sma III 部位を有しており、これらのいずれの DNA 配列を挿入しても、酵母でのプラスミドの分解誘導体の複製型の安定性に別して悪い影響を及ぼさず、DNA 配列を挿入することができる。これらの部位は、目的とする遺伝子、例えば *S. diastolicus* の DEX-1 遺伝子及び酵母プロモーターで発現されるヒト血清アルブミン遺伝子の導入のための遺伝子型として用いることができる。この方法を用いて、酵母形質転換体の選択マーカーとともにこのような遺伝子をこのようユニーク遺伝子型に挿入することができる。あるいは、プラスミド pSAC3U1、pSAC3U2、pSAC3I0 及び pSAC3C1 は、目的とする遺伝子を挿入するための発育体として用いることができる。この点に就いては、プラスミド pSAC3U1、pSAC3U2 及び pSAC3I0 は、URA 3 遺伝子の 3' - 非翻訳領域にユニーク Sma I 部位を有し

ている (Rose et al., 1984)。この Sma I 部位を、適当な目的とする遺伝子を挿入するための遺伝子型として用いることができる。

目的とする遺伝子を直接的にあるいは間接的に挿入するため (例えば URA 遺伝子を挿入し、次いでその Sma I 部位に目的とする遺伝子を挿入するような場合) Sma III 部位を用いることが望ましいか否かは、ペクターの分解に依つて異なる。即ち、パステリア DNA 配列の終端に依つており、このことが複製型の他の1つの局面を形成している。一般に、挿入された遺伝子から約10% 2 μ m 領域、特に酵母の複製オリジン (ori) から離れた Sma III 部位側の STB 領域まで転写が行われるのを止めるのが望まれている。従つて、挿入される配列は、(a) 目的とする遺伝子、(b) その ori 側に影響した部位上にあるプロモーター及び(c) 目的とする遺伝子の下流であつて血つ目的とする遺伝子と STB 領域との間にある 5' - 転写ターミネーターからなるのが好ましい。

引用文献

- Aigle et al., (1984). Journal of the American Society of Brewing Chemists, 42, 1.
Andrews et al., (1985) Cell, 40, 795.
Boggs, (1978). Nature, 273, 104.

Boggs, (1981). In: "Molecular Genetics in Yeast" Alfred Benzon Symposium No: 16. Munksgaard, Copenhagen.

Birnboim & Doly, (1980). Nucleic Acids Research, 7, 1513.

Boltivar, (1978). Gene, 4, 121.

Boustein & Davis, (1982). In "The Molecular Biology of the Yeast. *Saccharomyces*: Metabolism and Gene Expression", Eds. Strathern et al., Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Breach & Hicks, (1980). Cell, 21, 501.

Casadaban & Cohen, (1980). Journal of Molecular Biology, 158, 179.

Cashmore, et al., (1986). Molecular and General Genetics, 203, 154.

Chevallier & Aigle, (1979). FEBS Letters, 108, 179.

Chevallier, et al., (1980). Gene, 11, 11.

Clarke & Carbon, (1980). Nature, 287, 504.

- Clark-Walker & Miklos, (1974), European Journal of Biochemistry, 41, 359.
- Cohen et al., (1980), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 77, 1078.
- Falco & Dumas, (1985), Genetics, 109, 21.
- Fletcher, (1986), Journal of Theoretical Biology, 119, 197.
- Futcher & Cox, (1983), Journal of Bacteriology, 154, 612.
- Gerbaud et al., (1979), Gene, 5, 233.
- Grits et al., (1983), Gene, 25, 178.
- Grunstein & Hogness, (1975), Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 72, 3961.
- Guarideau, et al., (1974), Biochemical Biophysics Research Communications, 61, 462.
- Hadfield, et al., (1986), Gene, 45, 149.
- Harford & Oathys, (1985), DNA, 4, 80.
- Harford & Peters, (1987), Current Genetics, 11, 315.
- Kingsman, et al., (1985), Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 3, 377.
- Livingston, (1977), Genetics, 86, 73.
- Livingston & Hobbs, (1979), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 76, 3727.
- Mantatis et al., (1982), in: "Molecular Cloning: a Laboratory Manual", Cold Spring Harbour, New York.
- Murray et al., (1987), The EMBO Journal, 6, 4205.
- Nelson & Pangman, (1979), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 76, 6515.
- Newton, et al., (1981), IGN-UCLA Symposium on Molecular and Cellular Biology, 22, 501.
- Orr-Weaver, et al., (1981), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 78, 6554.
- Orr-Weaver, et al., (1985), In "Methods in Enzymology", Eds. Wu, et al., 101, 228, Academic Press, New York.
- Rine, et al., (1983), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 80, 6750.
- Ross et al., (1984), Gene, 29, 133.
- Rothstein, (1983), In "Methods in Enzymology", Eds. Wu, et al., 101, 202, Academic Press, New York.
- Selig et al., (1980), Nucleic Acids Research, 8, 3371.
- Sigurdson et al., (1981), Molecular and General Genetics, 183, 59.
- Som et al., (1986), Cell, 52, 27.
- Stevens, et al., (1979), Journal of Bacteriology, 140, 73.
- Struhl et al., (1979), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 76, 1035.
- Takeo et al., (1980), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 77, 3144.
- Tubb, (1980), Journal of the Institute of Brewing, 86, 78.
- Vieira & Messing, (1982), Gene, 19, 259.

Volker & Broach, (1986), *Cell*, **46**, 541.

Volker & Broach, (1987), *In Press*.

Wainsley, *et al.*, (1985), *Molecular and General Genetics*, **192**, 561.

Webster & Dickson, (1983), *Gene*, **26**, 243.

Winston, *et al.*, (1985), *In "Methods in Enzymology"*, Eds. Wu, *et al.*, **101**, 211.

Wu, *et al.*, (1986), *In "UCLA Symposium on Molecular and Cellular Biology: Yeast Cell Biology"*, Ed. Hien, **323**.

Yocum, (1985), 欧州特許出願 No 163491.

組換え前においては、同じ方向を有する2つのFLP認識部位のみと、右図しない例えばそれらの間にあるベクターDNA（例えば組換え部位のペアーによって分離されたプラスミドの2つの部分の短い配列として）とを有するプラスミドを構築してもよい。組換え後、このようなプラスミドは1個の組換え部位を有し、従って通常の2個の組換えを起こさず、A型とB型の混合集団とならない。このようなプラスミドは上記したプラスミドよりも不安定であるが、本発明の1局面を形成しそのものもクレームされる。

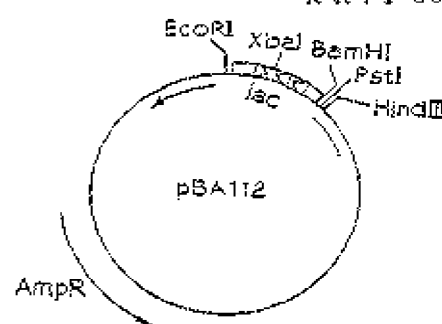


Fig. 1

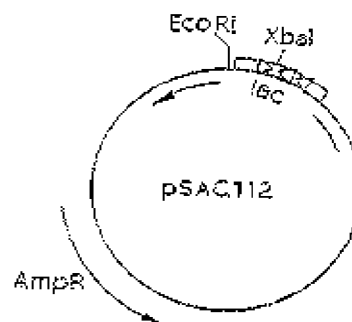


Fig. 2

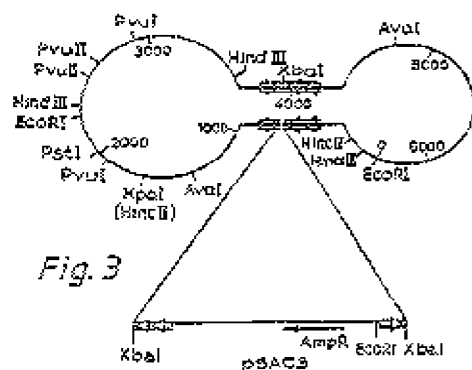


Fig. 3

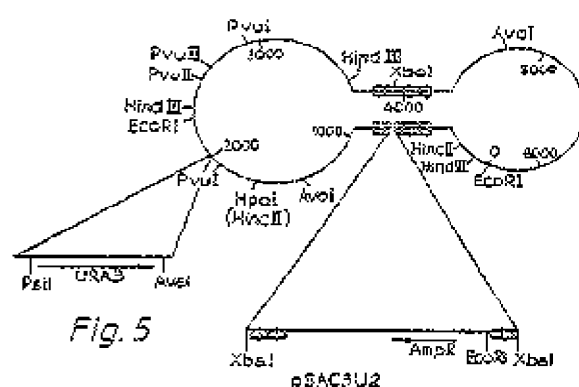


Fig. 5

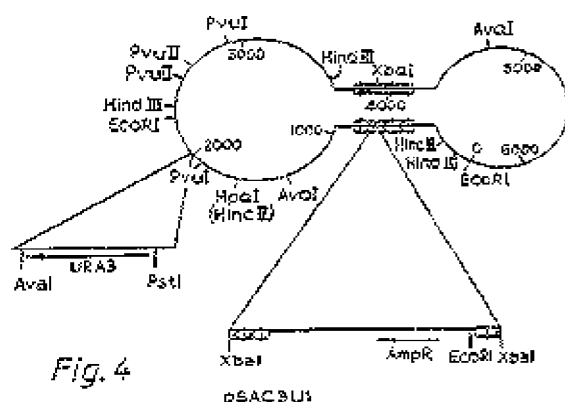


Fig. 4

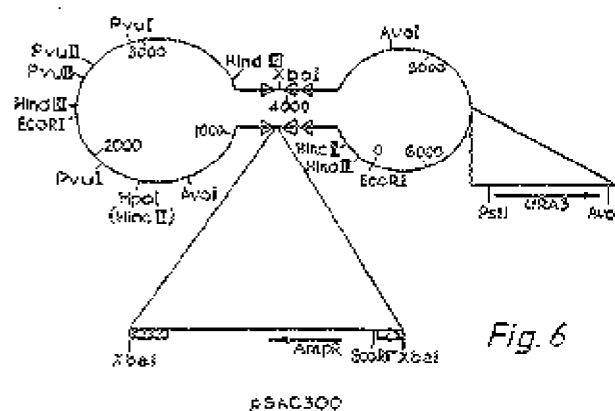


Fig. 6

Fig. 9 URA⁺及び bla^r の遺伝的結晶

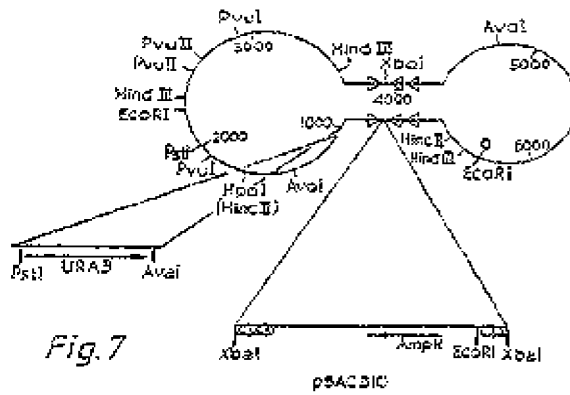


Fig. 7

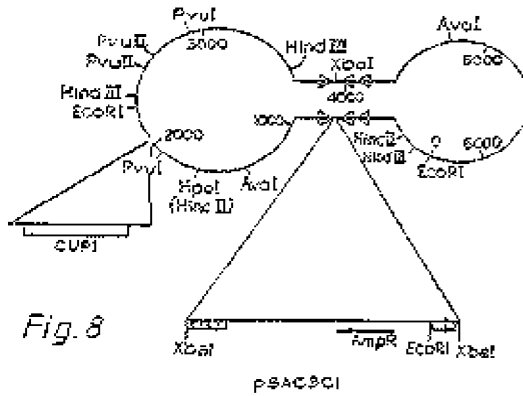


Fig. 8

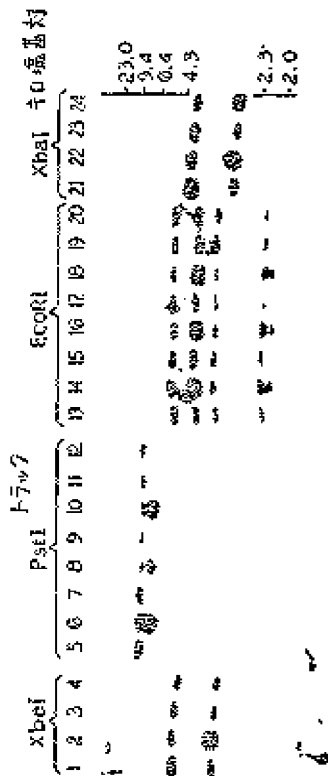
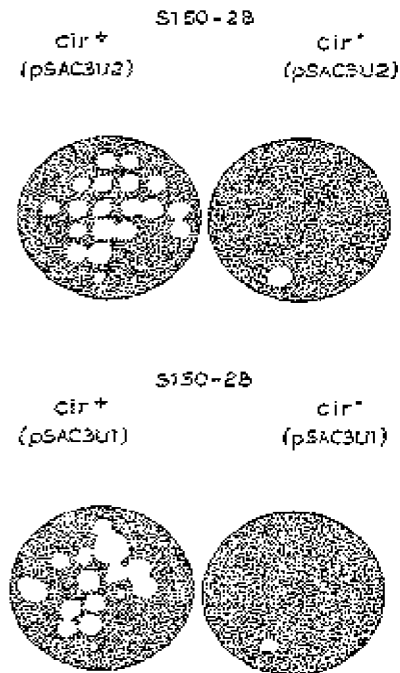


Fig. 10

国際調査報告

<p>International Application No. PCT/JP 86/00276</p> <p>1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</p> <p>C 12 N 1/66; C 12 N 1/16; C 12 P 1/02</p>											
<p>2. FIELD OF SEARCH</p> <p>C 12 N</p>											
<p>3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Document</th> <th>Relevance</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A. Genetic Engineering in Microbiology and Immunology, vol. 85, 1982, Springer Verlag (Berlin, DE).</td> <td>1-2, 13-15</td> </tr> <tr> <td>A. EP, A, 0202228 (DELA BIOTECNOLOGIA)</td> <td>7, 8</td> </tr> <tr> <td>P. V. NO, A, 02/02066 (FARMACIA INSTITUTO)</td> <td>1-3, 11, 14, 15</td> </tr> <tr> <td>E. Blamud, vol. 17, no. 1, 1987 (New York, US).</td> <td>1-3, 11, 14, 15</td> </tr> </tbody> </table>		Document	Relevance	A. Genetic Engineering in Microbiology and Immunology, vol. 85, 1982, Springer Verlag (Berlin, DE).	1-2, 13-15	A. EP, A, 0202228 (DELA BIOTECNOLOGIA)	7, 8	P. V. NO, A, 02/02066 (FARMACIA INSTITUTO)	1-3, 11, 14, 15	E. Blamud, vol. 17, no. 1, 1987 (New York, US).	1-3, 11, 14, 15
Document	Relevance										
A. Genetic Engineering in Microbiology and Immunology, vol. 85, 1982, Springer Verlag (Berlin, DE).	1-2, 13-15										
A. EP, A, 0202228 (DELA BIOTECNOLOGIA)	7, 8										
P. V. NO, A, 02/02066 (FARMACIA INSTITUTO)	1-3, 11, 14, 15										
E. Blamud, vol. 17, no. 1, 1987 (New York, US).	1-3, 11, 14, 15										
<p>4. SUMMARY</p> <p>The present invention relates to a method for the production of a recombinant DNA molecule. The method involves the use of a plasmid vector and a host cell. The plasmid vector is transformed into the host cell, and the recombinant DNA molecule is produced. The recombinant DNA molecule is then used to produce a protein.</p>											
<p>5. CLAIMS</p> <p>1. A method for the production of a recombinant DNA molecule, comprising the steps of: (a) transforming a plasmid vector into a host cell; (b) producing a recombinant DNA molecule; and (c) using the recombinant DNA molecule to produce a protein.</p>											
<p>6. REFERENCE TO DRAWINGS</p> <p>The drawings show the construction of the recombinant DNA molecule and the production of the protein.</p>											
<p>7. SIGNATURE</p> <p>20th June 1986</p> <p>PL VAN MOL</p>											

[illegible]

PRIME AND SECOND LEVEL OF ANALYSIS	PUBLICATION DATE	PRIME LEVEL ANALYSIS	SECOND LEVEL ANALYSIS
EP-A- 0203209	12-11-86	GE-A- JF-A- KO-A-	2175590 6123567 8642386
WO-A- 0705006	21-05-87	AO-A- SP-A-	5176937 0245483
EP-A- 0167198	05-07-85	AO-A- JF-A- JF-A-	3704184 00260306 18-12-85

Abstract

* For more general access, contact: the Official Journal of the European Patent Office, No. 02/04

14-00000-75 CONFIDENTIAL TO BE RELEASED		CONTINUED FROM THE SECOND PAGE
Source:	Glenn D. Tammert and William, Frank Johnson of the Tammert Group	Page 1 of 2
A	22. A. 047198 (BASH PUBLIC INFO) 3 July 1988, see 047198, page 21, line 23 - page 28, line 24 <div style="text-align: center;">***</div>	9

Page 487 of 526

② 發明者

チネリイ、シモン アンドリュ

イギリス国 エヌジ-13 8イーティー、ノッティンガムシャー、
ビンガム、マスターズ ロード、4